

制备多表位嵌合基因疫苗的方法

发明领域

本发明涉及一种人工创造基因疫苗的新方法，命名为多表位组装文库免疫技术（Epitopes Assemble Library Immunization, EALI）。本发明方法主要涉及采用基因改组随机串联的原理，构建不同长度大小的多表位嵌合基因表达文库而筛选多表位嵌合基因疫苗。

发明背景

自 1994 年 Stemmer 发明的 DNA 改组（DNA shuffling）并在《自然》杂志上发表后，许多有关基因人工进化的分子育种技术（molecular breeding technology）不断涌现（Juha P. *Int Arch Allergy Immunology*, **121**, 173-182.(2000)）。先后出现了多种基因改组的改良方案（Huimin Z. *et al. Nucleic Acids Research*, **25** (6),1307-1308.(1997); Andreas C. *et al. Nature*, **391** (15), 288-291.(1998); Miho K. *et al. Gene*, **236**,159-167.(1999)），交叉延伸方式（Huimin Z. *et al. Nature Biotechnology*, **16**, 258-261.(1998)）、逐次切割杂合酶创造技术（Marc O. *et al. Nature Biotechnology*, **17**, 1205-1209.(1999)）和模板过渡随机嵌合（Wayne M. C. *et al. Nature Biotechnology*, **19**, 354-359.(2001)）等方法。目前已有大量相关文献报道了应用分子进化技术的基本原理创造或改良基因的成功实例，应用领域亦由普通生物蛋白酶类发展到抗生素效价的提高，环境污染物的降解，病毒载体改造，直至医学药物的开发。但在作为人类第三代疫苗的 DNA 疫苗方面的应用尚是一片空白。虽有不少权威医学专家预测基因改组技术（gene shuffling）在基因疫苗方面的成功应用，对于解决目前严重危害人类生命健康的癌症、自身免疫性疾病和感染性疾病，具有广泛的应用前景（Dewey D.Y. R. *et al. Biotechnology Progress*, **16** (1),2-16.(2000); Phillip A P. *et al. Current Opinion in Biotechnology*, **8**, 724-733.(1997); Robert G. W. *et al. Curr*

Opin Mol Ther, 3 (1), 31-36.(2001))。但至今仍未见相关实质性文献或专利报道。

基因疫苗是上世纪90年代初发展起来的一门新的免疫学理论和技术，是仅次于减毒疫苗和亚单位疫苗的第三代疫苗(Wolff J.A. *et al. Science, 247, 1465-8.(1990)*)。基因免疫主要是将含有外源蛋白编码序列的质粒DNA直接注射机体，外源蛋白可在机体内直接表达并诱发机体产生免疫应答。与传统的蛋白免疫相比基因疫苗存在着诸多优点：如可免疫持效时间长；可同时产生体液免疫和细胞毒性T细胞反应；制备简单、方便，成本低廉；抗原稳定，运输便捷；等等。不仅兼有了重组亚单位疫苗的安全性和减毒活疫苗诱导全面免疫应答的高效力，而且可以人为引发机体产生特异的免疫反应类型。目前，基因疫苗已广泛地被应用到病毒、细菌、原生动物等传染性疾病和抗肿瘤治疗，以及机体过敏反应和新生儿耐受治疗等方面。在抗流感、艾滋病、狂犬病、乙型肝炎、结核病、疟疾和利什曼病等疾病应用中已取到可喜的进展 (Lai W.C. *et al. Crit Rev Immunol, 18(5), 449-84.(1998)*)。但对于严重影响人类健康的疟疾病原虫，艾滋病病毒和其它高度多变病毒，目前尚未有非常有效实用的疫苗问世。

为解决疾病病原体高度多变的生活特性问题，长期疫苗研究结果表明了同时使用多个时期多种抗原免疫策略势在必行(Doolan D.L. *et al. Int J Parasitol, 31(8), 753-62.(2001)*)。在多抗原疫苗方面，已有颇多研究报告和专利见报，但对其研究均集中在多抗原和多表位蛋白多肽疫苗的单一或组合类型非常有限的人工合成或重组疫苗研究。加上合成多肽疫苗成本昂贵——这令人感到遗憾的缺点，否定了肽疫苗的实际应用前景。目前，虽有少量多表位嵌合基因疫苗相关文献报道，但研究都集中在多表位基因间以人为、单一的方式嵌合，未能取得较多肽疫苗优势的免疫保护效果。本发明人鉴于前期构建多价重组DNA疫苗时，选用了3个恶性疟抗原表位（即MSA-1、NKND和CST3）人为按事先设计好的组合方式，进行了不同构建不同组合多表位基因，结

果发现多表位组合存在着组装的最佳方式（林澄涛等，中国生物化学与分子生物学报，1999，15（6）：974-977）。该数据说明了对于数量较少（小于3个）表位组合时，可以采用人工手段进行逐一组装构建取得最佳的组合方式。但对于多个（大于3）表位其组合方式繁多，采用此类方法进行组装构建，工作繁琐复杂，成本费用高，要大量的人力财力，不切实际。因此，如何有效地串联设计多表位基因，解决病原体多变问题为基因疫苗发展提出了全新的要求（Yu Z. et al. *Vaccine*, 16(17), 1660-7.(1998); Kumar S. et al. *Trends Parasitol*, 18(3), 129-35.(2002); Hoffman S.L. et al. *Dev Biol*, 104, 121-32.(2000); Li M. et al. *Chin Med J (Engl)*, 112(8), 691-7.(1999); Jiang Y. et al. *Chin Med J (Engl)*, 112(8), 686-90.(1999)）。

当今世界上严重危害人类健康的寄生虫病恶性疟疾的病原体恶性疟原虫生活史复杂，包括了人体内无性增殖、有性增殖和蚊体内有性增殖与孢子增殖四个发育阶段。人体内可分为红外（肝）期(和红内期；在蚊体内，可分为配子体期和子孢子期。这种复杂的生物学特点，使恶性疟原虫在抗宿主免疫保护力和抗药物方面具有高度灵活多变性，造成了单一保护性抗原疟疾疫苗的应用效果很不理想。

疟原虫所引起的临床症状主要是由其在宿主红细胞内的无性繁殖所导致的，红内期疫苗的设计直接针对疟原虫这个唯一的致病阶段。抗疟疾疫苗的研制历程先后经历了减毒环子孢子疫苗，亚单位疫苗和合成肽疫苗等不同时期，至今未获成功，主要原因是各类疫苗选用的抗原都得不到理想的保护作用。因此，目前公认在构建疟疾疫苗时必须选用多期多价表位的联合应用，才有可能获得满意的保护效果。然而，多期多价基因疫苗构建中对多肽基因的数量和连接顺序难以用手工操作的方式把握，同时表位DNA疫苗对体液免疫的诱导效果多不理想，这些都成为急待解决的技术瓶颈。

发明概述

根据本发明的一个方面，提供了一种制备多表位嵌合基因疫苗的方法，其原理是借助随机文库中基因重组构建新型基因疫苗，所述方法包括如下步骤：

- a) 选择并人工合成多个编码感兴趣抗原单表位的核酸分子，并定向克隆至一载体；
- b) 利用同尾酶技术在步骤 a) 获得的载体上构建编码随机串联双表位的核酸分子；
- c) 在步骤 b) 的编码双表位核酸分子的基础上，随机组装成不同长度多表位嵌合基因；
- d) 多表位嵌合基因按不同长度区间分离纯化、扩增后，分别亚克隆至表达载体并转入原核宿主，获得了数个相应长度区间的多表位嵌合基因表达文库；
- e) 检测每个表达文库中多表位嵌合基因的差异，确保基因文库的高度多态性；
- f) 以每个多表位嵌合基因文库免疫动物后，检测多表位嵌合基因文库中基因表达产物的免疫原性；
- g) 根据步骤 e) 和 f) 的检测结果，确定包含最佳组装的多表位嵌合基因疫苗的一个或几个基因文库；
- h) 利用免疫化学高通量技术从步骤 g) 确定的基因文库中筛选高免疫原性的多表位嵌合基因疫苗。

根据本发明方法，步骤 c) 的不同长度多表位嵌合基因的随机组装可同时采用以下两种途径以增加不同表位间的串联重组方式的随机性：1) 结合无引物和有引物聚合酶链式反应随机串联；2) 借助载体上的同尾酶位点进行随机串联。

根据本发明的另一方面，本发明提供了由本发明方法制得的多表位嵌合基因疫苗。在本发明的一个实施方案中，所述的多表位嵌合基因疫苗是针对恶性疟原虫的多表位嵌合基因疫苗。

附图简要描述

图 1 为随机组装多表位基因的示意图，图中 1.多个单表位基因的获得；2.随机串联双表位构建；3.无引物聚合酶链式反应；4.分离纯化不同大小 DNA 片段，建立嵌合基因文库。

图 2 示出不同条件下无引物聚合酶链式反应随机串联突变多表位基因图谱，所述图谱如下方法获得：以随机串联双表位基因混合为模板（浓度 0.5μg/μl, 0.5μl, 1.0μl, 2.0μl），配制 50μl 反应体系，进行无引物 PCR 扩增，循环数为 25, 35, 45, 55, 65, 75, 85。结果表明了在模板量少于 0.5μl (250ng) 时，随着循环数的不断增加，主要扩增产物片段不断增大；65-75 个循环，长度可达 2kb 左右，大于 85 个时，片段大于 4kb。

图 3 示出多表位嵌合基因疫苗在真核表达载体中基因结构，其中每个多表位基因下游具有共同的表位序列（即 E6_(MSA-1)），可作为基因功能表达分析检测标签。

图 4 示出不同组多表位嵌合基因文库中基因长度大小比较，图中 M, λ/HindIII; 1, No.1 文库基因 /EcoRI+BglII; 2, No.2 文库基因 /EcoRI+BglII; 3, No.3 文库基因 /EcoRI+BglII; 4, No.4 文库基因 /EcoRI+BglII; 5, No.5 文库基因 /EcoRI+BglII。

图 5 不同长度多表位基因文库基因多态性分析

A. 表示基因文库 No.3 的基因结构多态性为 96% (24/25); B. 表示基因文库 No.4 的基因结构多态性为 100% (25/25)。以载体 VR1012 多克隆位点的上下游引物，从文库中随机挑选 25 个重组克隆子，进行 PCR 反应，扩增产物经 100℃变性 10 分钟后，冰上放置 10 分钟。然后，与 10×上样缓冲液混合，进行聚丙烯酰胺凝胶 (10%浓度) 电泳，分析带型差异。

图 6 不同长度文库中混合多表位嵌合基因疫苗免疫小鼠后的抗体水平

八种表位 (E2_(NKND), E3_(MSA-2), E5_(EBA-175), E6_(MSA-1), E7_(LSA-1),

E8_(CS.T3/CSP), E9_(MSP-1), E11_(AMA-1)) 混合 200ng 包被, 5 个混合基因文库以 100μg DNA, (1:6.5,w/w)Dendrimer PAMAN G9 两次免疫 Balb/c 小鼠后产生抗血清, 2×倍稀释, 测定 OD₄₅₀ 值, 以 OD₄₅₀ 为 0.2 两倍于对照对应的稀释度。

图 7 不同长度文库混合多表位嵌合基因疫苗相应抗体的 IFA 检测稀释度

5 个混合基因文库以 100μg DNA 两次免疫 Balb/c 小鼠后产生抗血清, 2×倍稀释, 以阴性对照为参照, 荧光密度有明显差别为判断标准, 相对应的稀释度。

图 8 4 号文库混合表位基因疫苗相应抗体识别不同虫株天然虫抗原的共聚焦显微定位。

A. 恶性疟原虫 3D7 血片; B. 恶性疟原虫 FCC1 血片; C. 约氏疟原虫血片

图9 3号文库混合多表位嵌合基因疫苗相应抗血清识别3D7虫株天然抗原western杂交检测（稀释×3000）。

1. 3D7虫株培养液未经皂素(Spanin)处理; 2. 3D7虫株培养液经皂素处理; 3. 红细胞培养液对照; M. 蛋白标准低分子量(从上至下分子量为97, 66, 45, 30, 20.5, 14.4kDa)。结果表明了, 3号文库混合多表位嵌合基因疫苗相应抗血清稀释×3000倍后, 仍能与3D7虫株经皂素(Spanin)处理后多种天然抗原相识别。

图10 不同文库混合多表位嵌合基因疫苗对约氏疟的交叉保护

在空载体和生理盐水空白平行对照存在情况下, 不同文库 (No.2、No.3、No.4和No.5) 混合多表位嵌合基因疫苗三次免疫Balb/c小鼠(每组7只)后, 2×10⁵感染约氏疟虫数腹部注射攻击后, 每隔三天观察小鼠死亡情况。结果表明了No.2、No.3和No.4文库, 均有一定的保护性, 其中No.3文库(大约1200bp大小) 多表位基因的保护率高达42.8%。

图 11 高免疫原性抗原基因原核表达 Western 杂交, 图 11A.

SDS-PAGE; 图 11B. 杂交膜。1. 筛选获得的阳性克隆 SP312; 2. 载体; 3. 阴性克隆 SN33; 4. SN34; 5. SP352; 6. SN36。

图12 从文库中筛选获得的阳性（SP）和阴性（SN）克隆子体内免疫反应细胞因子检测。

优选实施方案的描述

本发明方法的原理参见图1所示。

根据本发明的方法，所述感兴趣抗原可以是各类感染性疾病、肿瘤、自身免疫性疾病等相关的抗原。本领域已知许多抗原表位的序列信息，依据这些信息可以合成步骤a) 中的编码感兴趣抗原单表位的核酸分子。

在将所述的兴趣抗原单表位的编码核酸分子克隆至载体上以后，本发明方法采用同尾酶技术将这些单表位基因随机串连形成双表位基因。现有技术中已知各种同尾酶，它们可以根据需要而用于本发明方法中。

根据本发明方法，在获得了双表位基因后，需要将它们随机组装成多表位嵌合基因。为了增加不同表位间的串联重组方式的随机性，在本发明的一个优选实施方案中，同时采用以下两种途径以进行不同长度多表位嵌合基因的随机组装：1) 结合无引物和有引物聚合酶链式反应随机串联；2) 借助载体上的同尾酶位点进行随机串联。

如此获得的随机组装的不同长度多表位嵌合基因接着按照不同长度区间进行分离，这些待分离长度可以根据需要而设定，通常从几百碱基对至几千碱基对。在本发明实施例所述的一个实施方案中，分离了长度分别为 300、800、1200、2000 和 4000bp 的 5 组随机组装的多表位嵌合基因。当然，本领域技术人员可以根据需要而设定任何合适的长度区间。接着，这些分离的不同组多表位嵌合基因可以在纯化和扩增后亚克隆进本领域已知的任何合适表达载体中，转化合适的宿主

细胞，获得数个多表位嵌合基因表达文库。

根据本发明方法，在获得多表位嵌合基因表达文库后，需要进行文库的多态性以及文库表达产物的免疫原性的检测，从中选择可能包含最佳组装的多表位嵌合基因疫苗的某一个或几个基因文库以供进一步筛选制备多表位嵌合基因疫苗。优选地，所述文库的多态性应在85%以上。确定最佳组装的标准是根据文库高度多态性和表达产物高免疫原性来选择，此外，还可增加根据感兴趣抗原表位的相关免疫学特征，如检测文库诱发机体产生的特异免疫类型和细胞因子或动物模型的交叉保护效果来确定。

在本发明的实施例中，本发明人从恶性疟原虫研究相关文献中选用已证明高免疫原性抗原表位序列（见表1），根据人类核苷酸密码子的偏爱性，修改获得相应的编码序列（见表2）。将14个表位片段重复后再随机连接，构建出不同长度的人工抗原库，每个库中又包含上千种不同连接方式的人工抗原。通过表位基因文库的免疫，在小鼠血清中获得很高的特异性抗体水平，同时又利用小鼠约氏疟模型，证实这些人工抗原具有交叉免疫保护性，由此说明依照本发明方法所建立的表达文库克服了现有文库的缺点，从而为获得理想的多表位嵌合基因疫苗奠定了基础。而实施例6的对文库的初步筛选结果表明，通过高通量免疫化学方法，可以筛选到具有更高免疫原性的多表位嵌合基因疫苗。

本发明中采用嵌合基因表达文库免疫机体的优势在于，即较cDNA表达文库免疫的不同之处在于：多表位嵌合基因文库免去了cDNA表达文库中非表位DNA序列的干扰问题（Shibui A. et al. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol*, **109**(3-4), 147-57.(2001); Smooker P.M. et al. *Vaccine*, **18**(23), 2533-40.(2000); Johnston S.A. et al. *Vaccine*, **15**(8), 808-9.(1997)），提高了基因疫苗的安全性。可以选择基因免疫预防和攻击靶点，更快地制备有效基因疫苗。同时，还可以得知文库中真正起保护作用的基因类型，有利于后续基因功能研究分析。

虽然在本发明实施例部分，以抗恶性疟疾多表位嵌合基因疫苗的制备为例描述了本发明，但是，本领域技术人员显然能够理解，本发明方法不仅限于抗恶性疟疾多表位嵌合基因疫苗的制备，其也适于各类感染性疾病、肿瘤、自身免疫性疾病等多种基因疫苗的制备。

下面结合附图和实施例对本发明做进一步的详细说明。

实施例 1：恶性疟原虫有效抗原表位基因片段的克隆及序列分析

1. 不同生活周期的 B 细胞和 Th 细胞抗原表位基因 DNA 序列的改造

为更加有效地抑制恶性疟原虫的生长和能在约氏疟动物模型中试验保护效果，根据相关文献检索，选用了恶性疟不同生活时期且与约氏疟有一定序列同源性的表面抗原 MSP-1、RESA、MSA-2、AMA-1、EBA-175、LSA-1、CS.T3、NKND 和 MAg-1 等 9 个基因 14 种表位（见表 1）。其中表位氨基酸序列相对应的核苷酸序列，采用人类偏好的密码子（见表 2，核苷酸序列粗体部分）。

2. 表位基因片段引物的设计与合成

a)根据 1 步骤改造的表位基因序列，设计 3' 端完全互补的两条引物（见表 2，互补序列为两引物交叉序列），并分别在表位基因序列上游引物和下游引物中引入 *BclII* 和 *BamHI* 两个同尾酶位点。

b)在不同抗原表位串联位点 *BclII* 和 *BamHI* 粘性末端连接处引入甘-脯-甘-脯（G-P-G-P）结构，以增加表位连接的空间结构柔性。

c)对于较长片段表位基因（如 E3_(MSA2) 和 E6_(MSA1)），则采用四条引物两次退火延伸获得全长基因。

3. 表位基因片段的克隆与序列分析

a)利用两条互补引物间匹配序列自身 PCR 退火、延生扩增，条件为 94°C, 30 秒, 45-60°C (视不同引物 Tm 值而定), 30 秒; 72°C, 40 秒, 40 个循环。

b)扩增产物经 1/10 体积 10M 醋酸胺和 2 倍体积无水乙醇沉淀浓缩，

重溶于超纯水。再经 *BclII* 和 *BamHI* 双酶切消化后，等体积苯酚处理，12000rpm，5 分钟，吸上清。上清液 1/10 体积 3M 醋酸钠 (pH5.2) 和 2 倍体积无水乙醇沉淀浓缩，重溶于超纯水。

c) 酶切产物与相同消化的载体 VR1012 (Vical 公司) 连接，转化大肠杆菌菌株 SK383 (GATC 甲基化修饰缺陷型)。经 *BclII* 和 *XbaI* 酶切筛选目的克隆子。

d) 将目的克隆子进行测序。测序引物 C038P：5'-CCAGACATAATAGCTGAC-3' 为载体 VR1012 多克隆位点上游序列。

实施例 2：恶性疟原虫抗原表位基因的随机串联组装

1. 双表位基因随机串联的构建

为了在序列同源性极低的表位基因间创造匹配区域，将实施例 1 中步骤 3 克隆的单表位基因，利用同尾酶酶切位点 *BclII* 和 *BamHI*，结合 *HindIII* 位点，进行双表位基因定向连接。为达到连接的随机性和提高效率，将各种单表位基因等量混合后，分成两份。其一用 *BclII* 和 *HindIII* 酶切；其一用 *BamHI* 和 *HindIII* 酶切。再将分别含有表位基因部分混合连接，电转化大肠杆菌 SK383 菌株，获得随机串联双表位基因克隆子。

2. 随机串联不同长度大小的多表位基因

为增加不同表位间的串联重组方式的随机性，我们同时采用了聚合酶链式反应和同尾酶随机串联两种方案构建多表位基因的随机串联，并最终将两组产物混合，构建 5 个不同片段长度(分别大约为 300、800、1200、2000 和 4000bp 区域) 的多表位串联基因(如图 4 所示)：

a) 聚合酶链式反应组装

将步骤 1 双表位重组质粒混合提取 DNA，经 *BclII/BamHI* 双酶切，低熔点琼脂糖凝胶电泳后，DNA 纯化试剂盒(Promega 公司)回收小片段，OD₂₆₀/OD₂₈₀ 测定浓度。

配制无引物聚合酶链式反应体系 (50μl)：

混合双表位 DNA	1μl
ExTaq DNA 聚合酶 (5U/μl)	2U
10×缓冲液	5μl
dNTP	8μl
d ₂ H ₂ O	36μl

反应条件 (25、35、45、55、65、75、85 个循环): 先经第一个程序: 94℃, 3min; 94℃,30sec; 42-55℃,30sec; 72℃,30sec; 25cycle; 72℃ 10 min。再经第二个程序: 94℃, 3min; 94℃,45sec; 50-55℃,45sec; 72℃,30sec, 1sec /cycle; 10cycle; 72℃ 10 min。无引物扩增反应产物, 进行 1%琼脂糖凝胶电泳, 结果如图 2 所示。说明多表位基因片段组装, 随着循环次数的增加而不断变大。切胶回收 5 个不同片段长度(分别大约为 300、800、1200、2000 和 4000bp 区域) 的 DNA 片段, 并加入上游引物 5' -ACATCATGCCTGATCA-3' 和下游引物 5' -TTAGCTAGCGGATCC-3', 进行常规 PCR 反应(反应体系参见无引物 PCR 体系, 程序为 94℃, 3min; 94℃,30sec; 50℃,30sec; 72℃,30sec; 30cycle; 72℃ 10 min), 扩增产物经 wizard PCR prep 纯化试剂盒 (Promega 公司) 浓缩纯化, 经 *Bcl*II 酶切后与载体 VR1012 的 *Eco*RV/*Bcl*II 双酶切产物连接, 电转化大肠杆菌菌株 SK383。具体路线和结果如图 1, 2 所示。

b) 同尾酶随机串联

将步骤 1 双表位重组质粒混合提取, 同样用 *Bcl*II/*Hind*III 双酶切的小片段(含表位基因)和 *Bam*HI/*Hind*III 双酶切大片段(含表位基因)连接, 电转化感受态 SK383 细胞, 构成四表位随机串联文库。同理, 构建了 5 个不同长度大小(分别大约为 300、800、1200、2000 和 4000bp 区域) 多表位基因的随机串联文库。

实施例 3: 恶性疟原虫多表位嵌合基因表达文库的构建

1. 分别含 Kozak 序列和终止密码子真核表达载体 VR10A 和

VR10T 的构建

设计含真核 Kozak 序列引物 1A: 5' -GATCACCATGGAATTG-3' 和 1B: 5' -GATCCGAATTCCATGGT-3'，自身引物退火，延伸，PCR 产物经 *BcII* 和 *BamHI* 酶切，以大肠杆菌菌株 SK383 为受体菌，克隆至载体 VR1012，获得重组质粒 VR10A，样品送至 Takara 生物公司测序。

为便于重组串联后多表位基因的功能分析，我们将终止密码子 TAATAA 放置于表位 E6_(MSA-1) 下游序列（见表 2，基因 E6 的引物 6D 序列），设计了引物 6A，6B，6C 和 6D，自身引物退火，延伸，PCR 产物经 *BcII* 和 *BgIII* 酶切，以大肠杆菌菌株 SK383 为受体菌，克隆至载体 VR1012，获得重组质粒 VR10T，样品送至 Takara 生物公司测序。

2. 五个不同长度片段的多抗原表位基因表达文库构建

a) 分别将实施例 2 中步骤 2 制备的五个不同长度片段的多抗原表位基因混合质粒 DNA，用 *BcII/HindIII* 双酶切后回收纯化片段（含表位基因）和质粒 VO10A 的 *BamHI/HindIII* 双酶切后片段（含起始密码子）连接，电转化感受态 SK383 细胞，分别获得混合重组质粒。

b) 同理，将步骤 a 中获得的 5 个混合重组质粒，利用 *BcII/HindIII* 和 *BamHI/HindIII* 双酶切，与步骤 1 中载体 VR10T 的含终止密码子的 DNA 片段连接，最终构建五个不同长度大小（分别大约为 300、800、1200、2000 和 4000bp 区域，）的多抗原表位基因表达文库（相对应分别为编号为 No.1、No.2、No.3、No.4 和 No.5），见图 4。

3. 不同组多表位嵌合基因表达文库中基因多态性分析

分别对文库 No.3 和 No.4 进行了以下步骤的基因单链多态性构象（PCR-SSCP），结果表明了两个文库中嵌合基因的多态性均在 95% 以上（24/25 和 25/25），如图 5 所示，具体步骤如下：

a) 文库中随机挑选 25 个克隆，以载体 VR1012 多克隆位点上游引物（C038P: 5' -CCAGACATAATAGCTGAC-3'）和下游引物（C039P: 5' -GATGGCTGGCAACTAGAA-3'）进行菌落 PCR（扩增条件 94

℃, 30sec, 55℃, 30sec, 72℃, 1min, 30 循环), 扩增产物经沸水水浴 10 分钟, 冰上冷却 10 分钟。与 10x 上样缓冲液混合。

b) 上述样品上样 10% 聚丙烯酰胺凝胶, 5V/cm 电压电泳, 电泳结束后, 凝胶牢固地在短玻璃板上。

c) 将凝胶玻璃放至大平底皿中, 加入凝胶固定液 (10% 冰醋酸 v/v) 淹没凝胶, 固定 20 分钟以上, 缓慢地水平摇动, 固定结束后回收固定液作为显色后的定影剂。

d) 用双蒸水漂洗凝胶 3 次。

e) 加入染色液 (2g 硝酸银, 3ml 37% 甲醛溶于 2 升去离子水中) 缓慢摇动 30 分钟。

f) 用双蒸水漂洗凝胶 20 秒 (注, 漂洗时间不宜过长)。

g) 加入预冷显影液 (2 升去离子水中加入 60g Na₂CO₃, 3ml 37% 甲醛, 400μl 10mg/ml 硫代硫酸钠, 放置水浴预冷至 10-12℃) 并缓慢摇动, 直至凝胶上显出条带 (通常 5-6 分钟出现)。

h) 向塑料皿中加入等体积凝胶固定液以终止显色反应, 缓慢摇动 2-3 分钟。

i) 双蒸水漂洗凝胶 3 次。

j) 凝胶在空气中干燥后, 即可在灯箱上识读序列。

实施例 4: 五个多表位基因文库免疫原性的检测

1. 不同组文库中多表位基因重组质粒的制备

将实施例 3 中步骤 2 构建不同长度片段的多抗原表位基因文库 (No.1, No.2, No.3, No.4 和 No.5) 分别从平板中混合洗涤到含相应抗生素的 LB 液体培养基中活化培养后, 1/100 接种量到 1 升含相应抗生素 LB 液体培养基, 培养至对数生长期, 收集菌体, 参见 Wizard Megapreps 质粒提取试剂盒(Promega 公司) 提取质粒, DU-70 紫外分光光度计 (Beckman) 测定 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值 DNA 浓度。

2. 各组混合表位嵌合基因文库免疫小鼠相对应抗血清的制备

用步骤 1 中所得基因疫苗文库的重组质粒以 100 μ g DNA，用无菌生理盐水调至等体积，肱四头肌，两腿等量注射免疫 Balb/c 小鼠，每组三个平行，以空载体和空白无 DNA 两组对照。每两周加强一次，共免疫 3 次。取血并收集免疫后多克隆抗血清。

3. 酶联免疫吸附实验 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 检测不同表位基因文库相应抗体水平

在阳性对照、阴性对照和空白对照的情况下，以混合表位合成肽为包被抗原，2 倍稀释待测抗血清（如 400、800、1600、3200、6400、12800、25600 和 51200），ELISA 检测不同多表位基因文库免疫后相应抗血清的最大稀释度（即滴度），结果如图 8 所示。表明了不同长度基因文库，存在免疫原性差异，并产生高度滴度抗体水平。具体实验步骤如下：

- a)包被：以单个或混合表位合成肽为包被抗原，用 pH9.2 的 0.1M 碳酸盐包被缓冲液稀释至所需的蛋白质浓度(200ng/100ul/孔)用加样器每孔加入100ul，然后将平板置湿盒中，4℃过夜，或37℃ 4h，将平板小孔中液体倾尽，用PBST洗板5次。
- b)封闭：每孔200ul 1% BSA，37℃ 1h。
- c)用PBST 洗板5次。
- d)加入一抗待检小鼠血清：待测抗血清用PBS溶液两倍稀释，每孔100ul稀释血清，每个浓度三个重复。4℃过夜
- e)PBST 洗板5次。
- f)加入辣根过氧化物酶标记抗体即马抗小鼠IgG-HRP:每孔中加入100ul经PBS/BSA稀释过的(1:1000)酶标抗体，置湿盒中37℃温育2h。
- g)PBST 洗板5次。
- h)显色。每孔加入底物显色缓冲液100ul，室温放置10min。
- i)每孔加50ul 1M H₂SO₄终止反应。
- j)Labsystems GenesisV3.03系统，读取450nm吸光度值，分析实验

结果。

(底物用显色缓冲液 (pH5.0)

A液： 柠檬酸 (无水)1.92g加DDW到100ml。

B液： Na₂HPO₄(含12个结晶水)7.16g加DDW到100ml。

将A液2.43ml， B液2.57ml 及水5ml 混合即成pH5.0的磷酸一柠檬酸缓冲液10ml。

显色反应前新鲜配制：

30% 过氧化氢 0.015ml

TMB 0.004g

加入到10ml磷酸一柠檬酸缓冲液中，既可用于显色反应。)

4. 不同基因文库多表位基因的多克隆抗血清识别天然蛋白的间接免疫荧光分析 (indirect immunofluorescence assay, IFA) 检测结果

为检测不同基因文库引发抗血清是否能识别恶性疟虫体天然蛋白，以及与约氏疟天然蛋白的识别情况，我们采用了间接免疫荧光分析 (IFA) 进行检测，并在阳性对照的情况下，确定抗体最大识别稀释度，以及共聚焦显微镜观察确定抗体结合位置。结果如图 7, 8 所示。具体实验步骤如下：

1) 与恶性疟原虫(*P. falciparum*)天然蛋白的识别

- a) 将恶性疟原虫 3D7 (或 FCC1) 株红内期混合期细胞 (感染率 2%左右) 均匀涂于载玻片上，室温风干。
- b) 用 100%丙酮固定 10 分钟。
- c) 室温风干。用荧光笔花圈标记，加入 1%BSA 的 PBS 室温封闭 30 分钟。
- d) 用 PBS 冲洗 3 次，每次 10 分钟，风干。
- e) 加入不同稀释度 (1:500, 1:1000, 1:2000, 1:4000) 的一抗血清 (小鼠抗血清)，室温，湿盒内 30 分钟，以 M26-32 单抗血清作为阳性对照。
- f) 用 PBS 洗 3 次，每次 10 分钟，风干。

g) 加入 1: 100 稀释的 FITC 标记的马抗小鼠 IgG, 37℃, 湿盒内 30 分钟。

h) 用 PBS 洗 3 次, 每次 10 分钟, 风干。

i) 用 50% 的甘油将盖玻片封在载玻片上, 立刻用荧光显微镜观察或共聚焦荧光显微镜扫图。

2) 与约氏疟原虫 (*P. yoelii*) 天然蛋白的交叉识别

a) 将约氏疟原虫株 (感染率 50% 左右) 均匀涂于载玻片上, 室温风干。

b) 下同 1) 与恶性疟原虫天然蛋白的识别实验步骤。

5. 不同多表位基因文库相应抗血清的 Western Blot 检测

为更直观地显示不同多表位基因文库疫苗相应抗血清识别恶性疟虫株的天然抗原的情况, 我们将实施例 4 步骤 2 得到的文库抗血清稀释后, 与皂素 (Spanin) 处理和 SDS-PAGE 分离的虫体蛋白进行 Western Blot。以 3 号基因文库为研究对象, 结果表明了 3 号文库基因疫苗引发的抗血清可以识别十几条不同大小的虫体蛋白, 具有较高的抗体水平, 如图 9 所示。具体步骤如下:

a) 样本处理 将 1-2 碟 3D7 虫株培养液离心收集, PBS 洗涤 2 次, 用终浓度为 0.2% 皂素处理, 破碎红细胞, PBS 再洗涤 2 次, 最后溶在一定体积的 PBS 溶液中, 并与 10×样品上样缓冲液混合沸水浴 10 分钟。

b) 免疫印迹 处理样本进行 SDS-PAGE 电泳分离。电泳完毕进行电转硝酸纤维素膜, 杂交膜用 3% BSA 室温封闭 1 小时后, PBS 洗涤 3 次, 加入一定量 BSA 稀释的文库抗血清, 室温作用 1 小时, PBS 洗涤 3 次, 加入碱性磷酸酶标记的马抗小鼠 IgG (Ap-IgG) 二抗, 室温作用 1 小时, PBS 洗涤 3 次。最后, 用碱性磷酸酶缓冲液 (100mmol/L Tris-HCl(pH9.5), 100mmol/L NaCl, 5 mmol/L MgCl₂) 漂洗一次。

c) 显色和终止 每 5ml 碱性磷酸酶缓冲液加入 33ul (以 50mg/ml

溶于 70%二甲基亚砜) 的氮蓝四唑和 16.5ul (10mg/ml 溶于 100% 二甲基亚砜) 的 5-溴-4-氯-3-吲哚-磷酸而成的溶液, 反应 10 分钟左右, 加入终止液 (20mmol/L Tris-HCl(pH 8), 5mmol/LEDTA) 终止反应。

实施例 5：不同文库混合多表位嵌合基因疫苗对 *P. yoelii* 疟原虫交叉保护

为更加有效的构建抗恶性疟多表位嵌合基因疫苗, 我们考虑了在约氏疟原虫动物模型中验证基因疫苗的保护作用。结果显示了五个多表位基因文库表现出不同程度的保护性(见图 10), 为人工改组的基因疫苗在恶性人疟原虫中的保护作用, 奠定了鼠内保护模型。具体实验步骤如下:

a)提取保藏液氮容器中的 *P. yoelii* 虫株, 37°C水浴融化, 500 μ l 腹部注射 Balb/c 小鼠体内复苏, 数天后, 经甲醇固定, Giemsa 染色, 显微镜下计数感染率。

b)尾部分离感染 *P. yoelii* 的小鼠血液, 滴至 CPBS 缓冲液(NaCl 3.2g, KCl 0.08g, Na₂HPO₄·12H₂O 1.16g, KHPO₄ 0.08g, Na-Citrate 3.8g, 加水至 500ml, pH7.2), 血球计算板计算感染红细胞浓度。

c)将实施例 4 步骤 2 中 3 次免疫的 Balb/c 小鼠, 以 2x10⁵ 个感染红细胞数/只的剂量, 腹部注射。

d)每隔 3 天分离尾部分离小鼠抗血清和涂片, 计数感染率, 同时观察对照组与实验组的小鼠的存活情况。

实施例 6：高通量免疫化学筛选获得高免疫原性多表位嵌合基因疫苗体内验证

从多表位基因文库的体内免疫反应原性检测(见实施例 4) 和约氏疟攻击保护实验结果(见实施例 5), 我们挑选高免疫反应水平和保护性的多表位基因文库, 通过高通量免疫化学筛选方案, 筛选获得几

个高免疫原性基因阳性克隆，在随机挑选阴性基因克隆和空载体存在的情况下，进行了原核系统表达的 Western 印迹检测和小鼠体内免疫反应的细胞因子 CD4 和 CD8 检测。

1. 原核系统表达的 Western 印迹检测

结果表明了筛选获得的高免疫原性基因 SP312 和 SP352 表达相应蛋白，在高倍稀释抗体后进行 Western 杂交检测，仍能够出现阳性杂交带，而随机选择低免疫原性基因 SN33，SN34，SN36 和空载体阴性对照均为出现信号带。说明了多表位基因 SP312 和 SP352 较基因 SN33、SN34 和 SN36 产生了更高滴度抗体水平(如图 11 所示)。

2. 小鼠体内免疫反应的细胞因子 CD4 和 CD8 检测

对筛选获得的阳性(高免疫原性)基因克隆 SP312、SP352 和 SP462 进行了体内免疫验证，在阴性(低免疫原性)基因克隆和空载体存在情况下，分别三次免疫 Balb/c 小鼠，分离脾淋巴细胞进行流式细胞分捡检测细胞因子 CD4 和 CD8。结果表明了阳性(高免疫原性)基因克隆 SP312、SP352 和 SP462，主要诱导 CD4 细胞因子的产生，同时伴随一定程度的 CD8 细胞因子的产生。其中阳性多表位基因 SP312 明显高于 SP352 和 SP462，而阴性多表位基因则与空载体相当。证明了通过高通量免疫化学方法，可以筛选到具有更高免疫原性的多表位嵌合基因疫苗(如图 12 所示)。

表 1 本发明所选恶性疟原虫不同生活周期的 B- 和 Th 抗原表位氨基酸序列

表位基因	氨基酸序列	抗原基因	生活时期	免疫细胞类型	参考文献
E2 _(NKND)	NKNDNKND	NKND	交叉	B	Cheng Q, 1991
E3 _(MSA-2)	KNESKYNSNTFINNAYNMSIRRSM	MSA-2	红内期	B/Th	Symthe JA, 1991
E4 _(RESA)	EEVEHDA	RESA	红内期	B	Chauhan VS, 1993
E5 _(EBA-175)	EREDERTLTKEYEDIVLK	EBA-175	红内期	B	Sim BK, 1994; 1998
E6 _(MSA-1)	LDNIKDNV/GKMIEDYIKKNKK	MSA-1	红内期/肝内期	B/Th	Kumar A, 1992;
E7 _(LSA-1)	EQQSDELQERL(R)AKEKLQ	LSA-1	肝内期	B/Th	Chauhan VS, 1993
E8 _(CS.T3.CSP)	KKIAKMEKAASSVFNV	C.S.T3/CSP	孢子期	Th	Aidoo M, 2000
E9 _(MSP-1)	NSGCFRHLDERECKCLL	MSP-1	红内期	B	Smigaglia F, 1988
E10 _(MSP-1)	EDSGGSNGKKITCECTKPDS	MSP-1	红内期	B	Chang SP, 1992
E11 _(AMA-1)	DGNCEDIPIIVNNEFSAIDL	AMA-1	红内期	B	Shi XP, 1999
E12 _(AMA-1)	GNAEKYDKMDEPQHYGKS	AMA-1	红内期	B	Lal AA, 1996
E15 _(AMA-1)	DQPQYEQQHLTDYEKIKEG	AMA-1	红内期	Th	Lal AA, 1996
E16 _(MSP-1)	GISYYEKVLAKYKDDLE	MSP-1	红内期	Th	Udhayakumar V, 1995
E17 _(MAG-1)	QTDEIKNDNI	MAG-1	红内期	B/Th	Lu Y, unpublished

表 2 表位基因克隆所用引物序列

表位基因	引物序列
E2 _(NNND)	2A: 5' -ACATCATGCCT' GATCA <u>AAGAACGACAACA</u> -3' BcII
A <u> </u> B	2B: 3' -TGTTCCTTGCTGTCT <u>GCTGCTAG</u> ' GCGC-5' BamHI
E3 _(MSA-2)	3A: 5' -ACATCATGCCT' GATCA <u>AAGAACGAGGAAAGTACAG</u> -3' BcII
A <u> </u> B <u> </u> C D	3B: 3' -GCTCTCGTTCA <u>TGTCGGAAAGTAGTGTG</u> GGATG-5' 3C: 5' -CATCA <u>ACAAACGCTACAAACATGAGCATCCGGCGACGGATGG</u> -3' 3D: 3' -GGCGGGTGTAC <u>CCGGGGGGGGCTAG</u> ' GCGC-5' BamHI
E4 _(RESA)	4A: 5' -ACATCATGCCT' GAT <u>CAAGGAGAACGTGGAGC</u> -3' BcII
A <u> </u> B	4B: 3' -TCCTCTGGCAC <u>CTCGTGTGGGGCTAG</u> ' GCGC-5' BamHI
E5 _(EBA-175)	5A: 5' -ACATCATGCCT' GAT <u>CAAGGAGGCCACCCCTGACCAAGGAGTACG</u> -3' BcII
A <u> </u> B	5B: 3' -GACTGGTCC <u>TCATGCTCCGTAGCAGGACTTCCC</u> GGCCCTAG' GCGC-5' BamHI
E6 _(MSA-1)	6A: 5' -ACATCATGCCT' GAT <u>CACTGGGACAACATCAAGGACAACGTGGC</u> -3' BcII
A <u> </u> B C D	6B: 3' -TCCTGGCACC <u>GGTTCTACCTCCCTGATGTA</u> GTCTCTTGT-5' 6C: 5' -TACATCA <u>AGAACAAAGAACGCCCCGGATCCGC</u> -3' 6D: 3' -CGGGCCTAG' GCGAT <u>CGATTCTAGAAGG</u> -5' BamHI
E7 _(LSA-1)	7A: 5' -ACATCATGCCT' GAT <u>CAAGGAGGCCAGGGACCTGGAGCAGG</u> -3' BcII
A <u> </u> B	7B: 3' -GTCCTCGGGACC <u>GGTTCTCGACGTCCGGGGGGCTAG</u> ' GCGC-5' BamHI

E8(cs,rs,sp)	8A:	5' -ACATCATGCCT' GATCAAAGAAGATGCCAAGATGGAGAAGGCCAGCAGC-3' <u>BcII</u>	
A	8B:	3' -CTCTTCGGTGTGGCACAAAGTGCACCCGGGGCGGGCTAG' GCGC-5' <u>BamHI</u>	B
E9(msp-1)	9A:	5' -ACATCATGCCT' GATCAAACAGCGGCTTCCGCACCTGGACCGAGCC-3' <u>BcII</u>	
A	9B:	3' -TGGACCTGGCTCGGCTCCACGGACGAGCAACGGCAAGAAAGATCACCTGC-3' <u>BamHI</u>	B
E10(msp-1)	10A:	5' -ACATCATGCCT' GATCAAACAGCGGCTTCAACGGACGAGCAACTGGCCTAG' GCGC-5' <u>BcII</u>	
A	10B:	3' -TTCTCTTAAGGACGAGCAACGGCAAGAAAGATCACCTGC-3' <u>BamHI</u>	B
E11(ama-1)	11A:	5' -ACATCATGCCT' GATCAGACGGCAACTGGAGGACATCCCCACGTGAAC-3' <u>BcII</u>	
A	11B:	3' -TAGGGCTGGACTTGCTCAAGTCCGGTAGCTGGACCCCTAG' GCGC-5' <u>BamHI</u>	B
E12(ama-1)	12A:	5' -ACATCATGCCT' GATCAGGCAAGGCCAAACTGACAAGATGGACAGGCCG-3' <u>BcII</u>	
A	12B:	3' -TTCTACTCTGGCTGGCTGTGATGCCCTCTCGCCTAG' GCGC-5' <u>BamHI</u>	B
E15(ama-1)	15A:	5' -ACATCATGCCT' GATCAGACCAGCCAGTACGAGCCACCTGACCGAC-3' <u>BcII</u>	
A	15B:	3' -TCTGGCTGGCTGTGATGCCCTCTAGTTCCCGCTAG' GCGC-5' <u>BamHI</u>	B
E16(msp-1)	16A:	5' -ACATCATGCCT' GATCAGGCAACTACGCTAACTAGGAGGTGCTGCCAAG-3' <u>BcII</u>	
A	16B:	3' -TTCCACGACGGTTCATGTTCCTGGACCTCCCTAG' GCGC-5' <u>BamHI</u>	B
E17(msp-1)	17A:	5' -ACATCATGCCT' GATCACAGACCGAGGAGATCAAGAACGACACATCCAGACCGAT-3' <u>BcII</u>	
A	17B:	3' -GTGTAGGTCTGGCTACTTTACTATTAACTTAGCTGGC-5' <u>BamHI</u>	B

权利要求

1. 一种制备多表位嵌合基因疫苗的方法，所述方法包括如下步骤：

- a)选择并人工合成多个编码感兴趣抗原单表位的核酸分子，并定向克隆至一载体；
- b)利用同尾酶技术在步骤 a)获得的载体上构建编码随机串联双表位的核酸分子；
- c)在步骤 b) 的编码双表位核酸分子的基础上，随机组装成不同长度多表位嵌合基因；
- d)多表位嵌合基因按不同长度区间分离纯化、扩增后，分别亚克隆至表达载体并转入原核宿主，获得了数个相应长度区间的多表位嵌合基因表达文库；
- e)检测每个表达文库中多表位嵌合基因的差异，确保基因文库的高度多态性；
- f)以每个多表位嵌合基因文库免疫动物后，检测多表位嵌合基因文库中基因表达产物的免疫原性；
- g)根据步骤 e)和 f)的检测结果，确定包含最佳组装的多表位嵌合基因疫苗的一个或几个基因文库；
- h)利用免疫化学高通量技术从步骤 g)确定的基因文库中筛选高免疫原性的多表位嵌合基因疫苗。

2. 根据权利要求 1 的方法，其中步骤 c) 的不同长度多表位嵌合基因的随机组装同时采用以下两种途径进行：1) 结合无引物和有引物聚合酶链式反应随机串联；2) 借助载体上的同尾酶位点进行随机串联。

3. 根据权利要求 1 的方法，其中步骤 a) 中所述的兴趣抗原是感染性疾病、肿瘤或自身免疫性疾病相关抗原。

4. 根据权利要求 3 的方法，其中步骤 a) 中所述的兴趣抗原是

恶性疟原虫抗原。

5. 根据权利要求 1 的方法制备的多表位嵌合基因疫苗。
6. 根据权利要求 5 的多表位嵌合基因疫苗，其为抗恶性疟疾的基因疫苗。

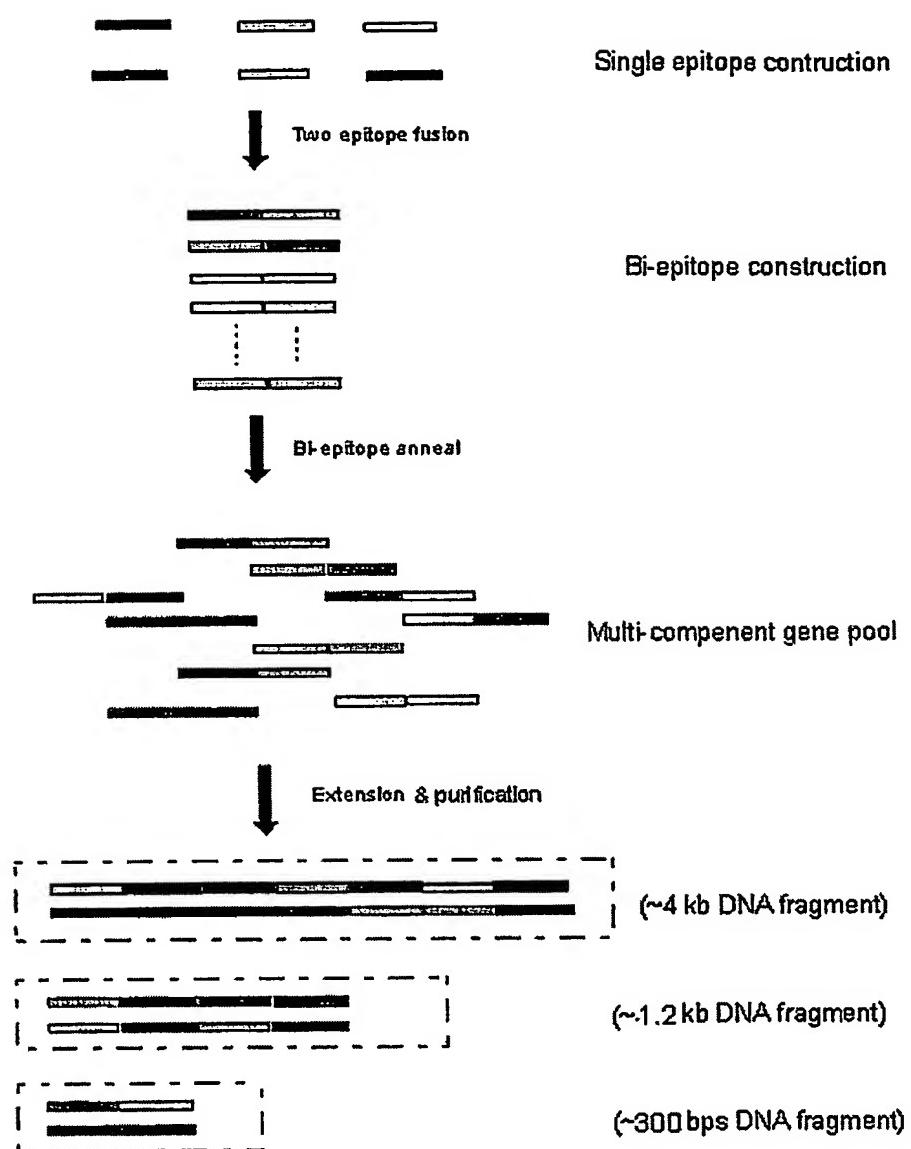


图 1 EALI 随机组装多表位基因简图

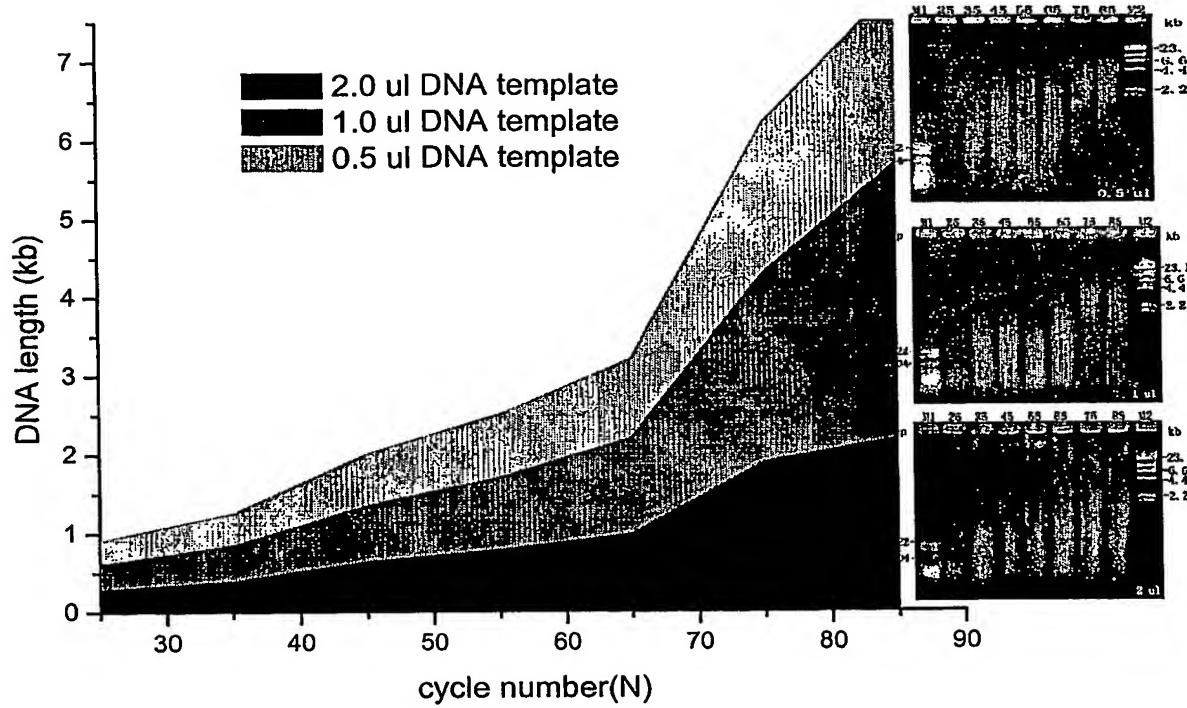


图 2 不同条件下无引物聚合酶链式反应随机串联突变多表位基因图谱

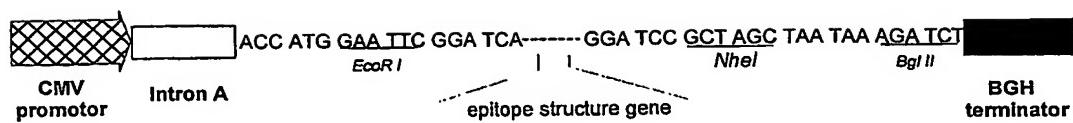


图 3 多表位基因疫苗在真核表达载体中基因结构

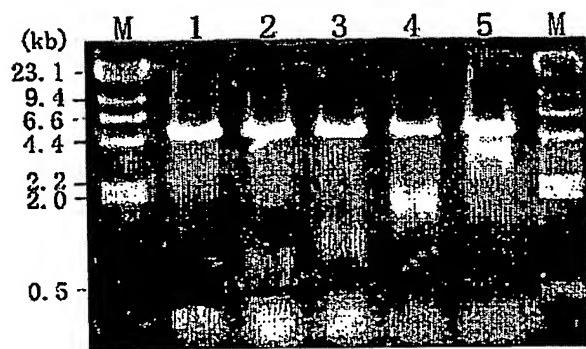
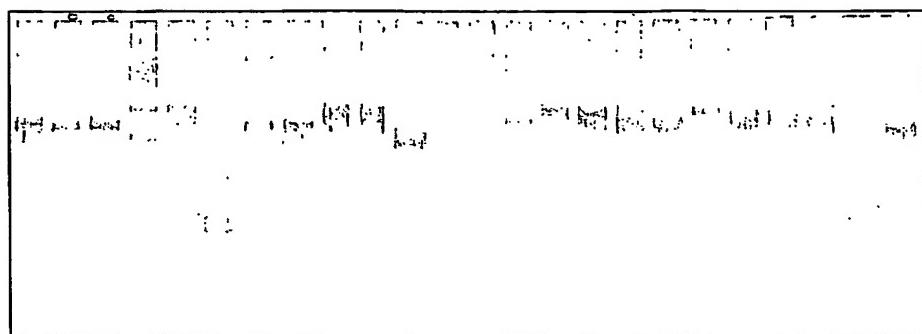


图 4 不同长度多表位基因表达文库中基因大小

A



B

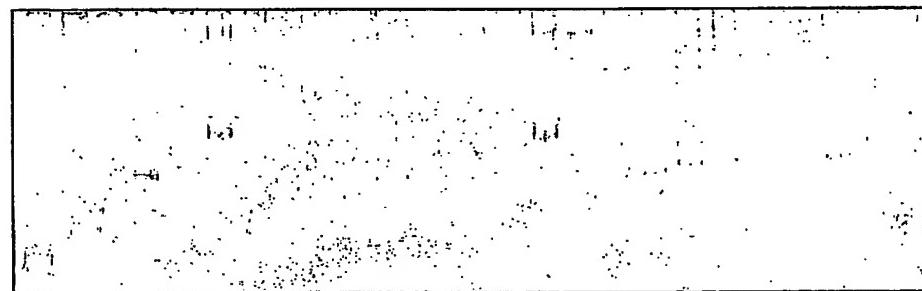


图 5 不同长度表位基因文库基因多态性 PCR-SSCP 分析

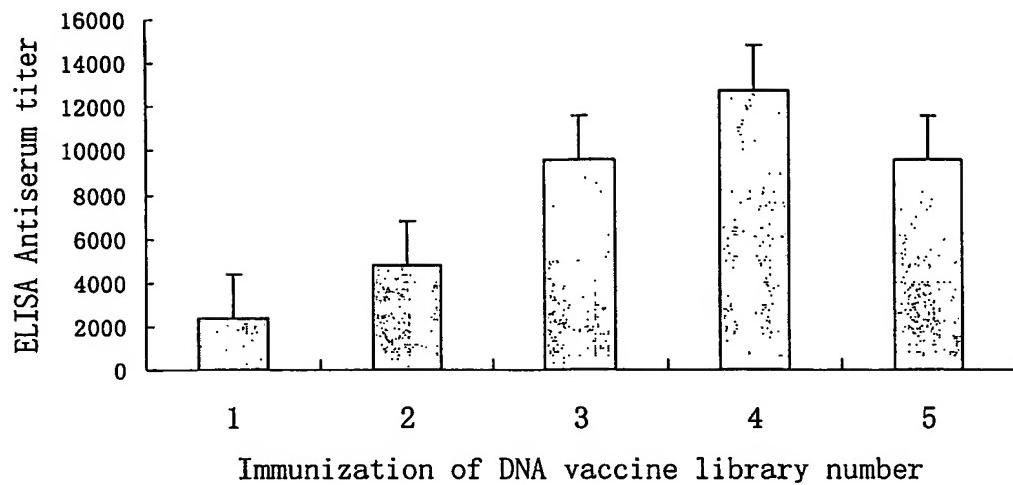


图 6 不同长度表位基因文库相应抗体库抗体识别虫咬牛的ELISA抗体稀释度

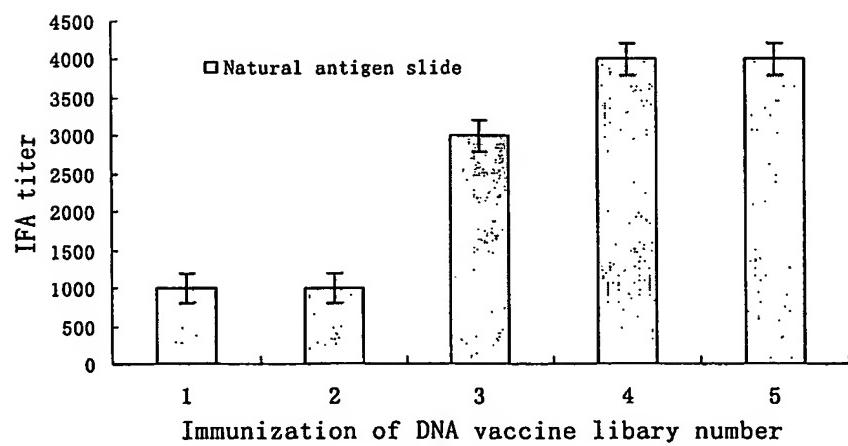


图 7 不同长度表位基因文库相应抗体库抗体识别天然虫抗原的稀释度

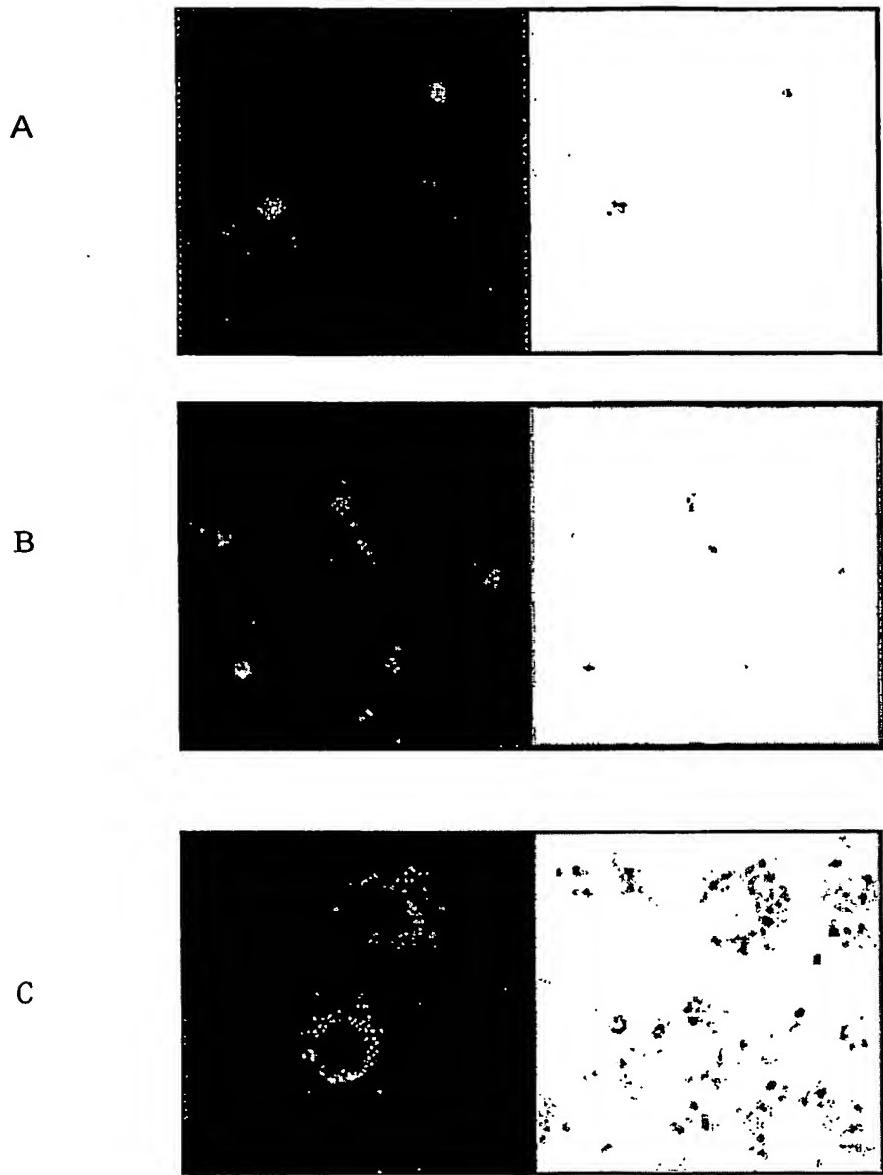


图 8 4 号文库混合表位基因疫苗相应抗体识别不同虫株天然虫抗原的共聚焦显微定位

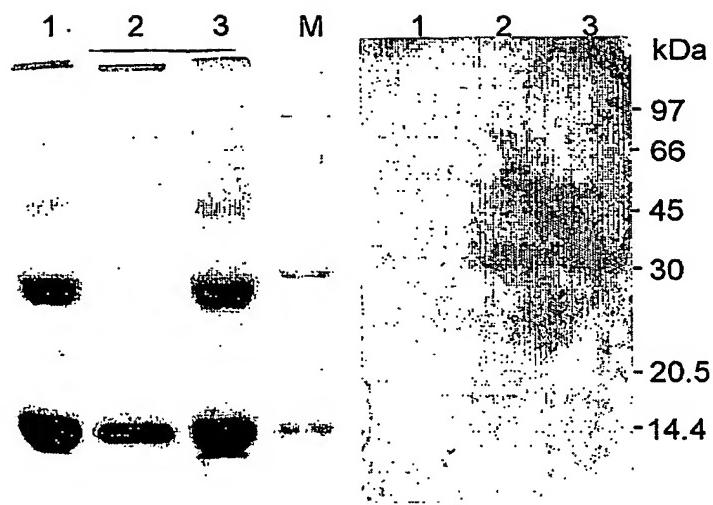


图9 3号文库混合表位基因疫苗相应抗血清识别3D7虫株天然抗原 western杂交 (稀释×3000)

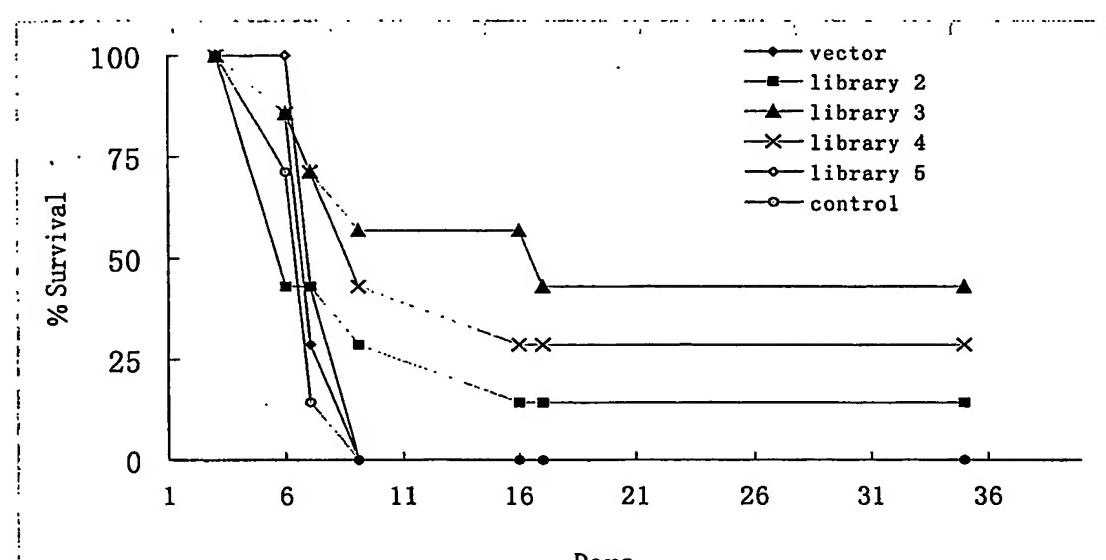


图10 不同文库混合表位基因疫苗对约氏疟的交叉保护

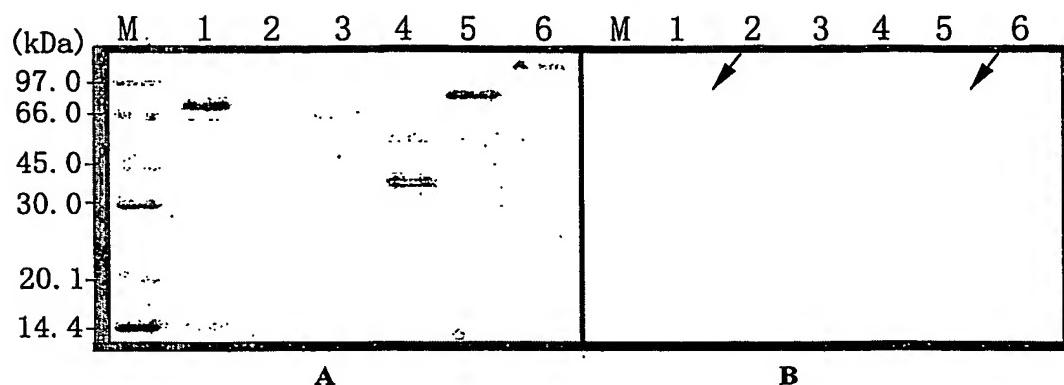


图 11 高免疫原性抗原基因原核表达 western 杂交

A. SDS-PAGE; B. 杂交膜

1. SP312; 2. vector; 3. SN33; 4. SN34; 5. SP352; 6. SN36.

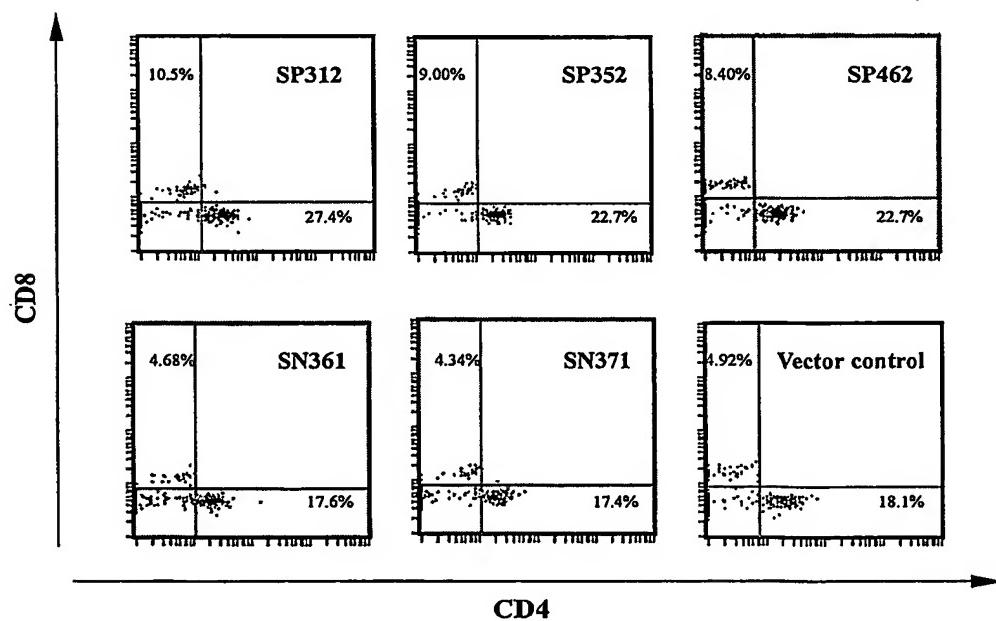


图12 从文库中筛选获得的阳性 (SP) 和阴性 (SN) 克隆子体内免疫反应细胞因子检测

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN03/00620

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC⁷ C12N15/30 C12N15/09 C12N15/67 A61K39/015 A61P31/00 A61P35/00 A61P37/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC⁷ C12N15/30 C12N15/09 C12N15/67 A61K39/015 A61P31/00 A61P35/00 A61P37/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNPAT WPI EPODOC NCBI

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP0198328A 22.Oct 1986, Refer to the Abstract	1-6
A	WO02064161A2 22.Aug 2002, Refer to the Abstract	1-6

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim (S) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
24 May 2004(24.05.04)

Date of mailing of the international search report

03 · JUN 2004 (03 · 06 · 2004)

Name and mailing address of the ISA/CN
6 Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District,
100088 Beijing, China
Facsimile No. 86-10-62019451

Authorized officer

Guo Xiaoyong
Telephone No. 8610-62085057

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT / CN03/00620

EP0198328A	Publishing Date: 22 Oct 1986	Patent family members:
		AU5539886A Publishing Date: 09 Oct 1986
		DK8601125A Publishing Date: 05 Oct 1986
		ZA8602356A Publishing Date: 06 Oct 1986
		JP61289888A Publishing Date: 19 Dec 1986
		US5017487A Publishing Date: 21 May 1991
		EP0198328B1 Publishing Date: 01 July 1992
		DE3685833G Publishing Date: 06 Aug 1992
		CA1316849C Publishing Date: 27 April 1993
		JP7265085A Publishing Date: 17 Oct 1995

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN03/00620

A. 主题的分类IPC⁷ C12N15/30 C12N15/09 C12N15/67 A61K39/015 A61P31/00 A61P35/00 A61P37/00

按照国际专利分类表(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类体系和分类号)

IPC⁷ C12N15/30 C12N15/09 C12N15/67 A61K39/015 A61P31/00 A61P35/00 A61P37/00

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称和, 如果实际可行的, 使用的检索词)

CNPAT WPI EPODOC NCBI

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求编号
A	EP0198328A 22.10 月 1986, 参见摘要	1-6
A	WO02064161A2 22.8 月 2002, 参见摘要	1-6

 其余文件在 C 栏的续页中列出。 见同族专利附件。

* 引用文件的专用类型:

“A” 明确叙述了被认为不是特别相关的一般现有技术的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先的申请或专利

“L” 可能引起对优先权要求的怀疑的文件, 为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布的在后文件, 它与申请不相抵触, 但是引用它是为了理解构成发明基础的理论或原理

“X” 特别相关的文件, 仅仅考虑该文件, 权利要求所记载的发明就不能认为是新颖的或不能认为是有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 权利要求记载的发明不具有创造性

“&” 同族专利成员的文件

国际检索实际完成的日期

24.5 月 2004(24.05.04)

国际检索报告邮寄日期

03 · 6月 2004 (03 · 06 · 2004)

国际检索单位名称和邮寄地址

ISA/CN

中国北京市海淀区西土城路 6 号(100088)

传真号: 86-10-62019451

受权官员



电话号码: 86-10-62085057

国际检索报告
关于同族专利成员的情报

国际申请号
PCT/CN03/00620

检索报告中引用的专利文件	公布日期	同族专利成员	公布日期
EP0198328A	22.10月1986	AU5539886A	09.10月1986
		DK8601125A	05.10月1986
		ZA8602356A	06.10月1986
		JP61289888A	19.12月1986
		US5017487A	21.5月1991
		EP0198328B1	01.7月1992
		DE3685833G	06.8月1992
		CA1316849C	27.4月1993
		JP7265085A	17.10月1995

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.